



TITLE:

Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Samata, Bumpei

CITATION:

Samata, Bumpei. Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1. 京都大学, 2017, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20284>

RIGHT:

京都大学	博士（医科学）	氏名	佐俣文平
論文題目	Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1 (LRTM1を用いたヒトES/iPS細胞由来機能的ドパミン神経前駆細胞の純化)		
(論文内容の要旨)			
<p>パーキンソン病は中脳黒質にあるドパミン神経細胞が進行性に脱落変性することによって生じる神経変性疾患である。初期治療では薬物治療がよく奏功するが、病態が進行するとともに、徐々に症状のコントロールが困難になる。根本的な原因はドパミン神経細胞の減少にあることから、その補充を目的とした細胞移植治療が注目されている。パーキンソン病は最も多く細胞移植治療が実施されている神経疾患であり、ヒト胎児中脳腹側組織を移植する治療では10年以上の持続的な有効性が報告されている。しかし、一部の症例では移植後の不随意運動が明らかにされており、移植細胞の質と量を揃えることが難しい点、そして生命倫理の問題などが課題となっている。</p> <p>近年、ヒト胚性幹（ES）細胞またはヒト人工多能性幹（iPS）細胞の開発により、臨床応用に向けた幹細胞移植治療研究が世界中で加速している。しかし、分化誘導後の細胞には増殖性細胞や目的以外の細胞が混在しているので、安全性の観点からこれらの細胞を事前に取り除く必要がある。</p> <p>セルソーターは細胞の散乱光や蛍光の情報を二次元座標上にプロットすることで、目的の細胞集団を生きた状態のまま選別できる装置である。また、特定の細胞に発現している表面抗原に対して、予め標識抗体を結合させて蛍光標識しておけば、そのシグナルを指標にした細胞選別も可能である。これまでにドパミン神経前駆細胞に発現する細胞表面抗原としてCorinやAlcamが報告されている。しかし、いずれのマーカーも中脳腹側以外にも発現していることから、より特異性の高い中脳腹側マーカーの使用が望ましい。</p> <p>そこで本研究では、中脳腹側細胞に特異的に発現する細胞表面抗原を同定することによって、ドパミン神経前駆細胞の純化を試みた。一般的に、神経上皮を起源とするfloor plate細胞は、成熟分化とともに神経細胞への分化能が失われるが、中脳由来のfloor plate細胞に限っては、ドパミン神経細胞への分化能を有することが分かっている。そこで、中脳マーカーであるLmx1aとfloor plateマーカーであるCorinを組み合わせることにより、中脳由来のfloor plate細胞の選別を行った。Lmx1aは転写因子であることから、Lmx1a::GFPノックインマウスES細胞を樹立し、9日間誘導した細胞を抗CORIN抗体で標識することによってCORIN+LMX1A+細胞を得た。そして、Lmx1a::GFPノックインマウスES細胞のGFP+細胞群の中から、CORIN+細胞で2倍以上の遺伝子発現量を示す候補83個を明らかにした。同様に、胎生11日齢マウス中脳腹側細胞群の中から、CORIN+細胞で2倍以上の遺伝子発現量を示す候補677個を明らかにした。最終的に、両者で共通して発現しており、尚且つ中脳腹側に特異的発現パターンを示す細胞表面抗原遺伝子としてLrtm1(Leucine-rich repeats and transmembrane domains 1)を同定した。</p> <p>14日間培養したヒトES/iPS細胞を、抗LRTM1抗体を用いて選別したところ、ドパミン神経前駆細胞の割合を80%以上に高めることができた。パーキン</p>			

<p>ソン病モデルラットを用いた移植実験では、LRTM1+細胞を移植した群で未選別細胞を移植した群よりも早期の運動機能症状の改善が認められた。また、移植 3 ヶ月目の脳切片の評価では、生着した細胞中に占めるドパミン神経細胞の割合は、未選別細胞群と LRTM1-細胞群ではそれぞれ 4.2%と 0.3%であったのに対し、LRTM1+細胞群では 29.0%まで高くなることが分かった。さらに、パーキンソン病モデルカニクイザルを用いた移植実験においても、移植 3 ヶ月目の脳切片の評価では、LRTM1+細胞由来の移植片に多数のドパミン神経細胞の生着が認められ、いずれの個体においても腫瘍形成は認められなかった。</p> <p>以上の結果から、LRTM1 を用いる細胞選別操作によって、安全性と有効性に優れたドパミン神経前駆細胞の純化が可能であると考えられる。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>パーキンソン病は中脳黒質にあるドパミン神経細胞が進行性に変性脱落することによって振戦や筋強剛などが生じる神経難病である。根本的な原因はドパミン神経細胞の減少にあることから、その補充を目的とした細胞移植治療が注目されている。しかしヒト多能性幹細胞を用いる細胞移植では、移植細胞に未分化細胞や非ドパミン神経細胞等が混在することがあり、安全かつ有効な治療を実現するにはドパミン神経細胞の純度を高めることが望ましい。本研究では、中脳ドパミン神経細胞が floor plate (FP) 細胞から分化することに着目し、中脳 FP 細胞特異的表面マーカーの同定を試みた。</p> <p>まずマウス胎仔脳およびマウス ES 細胞由来神経細胞において中脳マーカー<i>Lmx1a</i> と FP マーカー<i>Corin</i> の両方を発現している細胞の網羅的遺伝子解析を行い、中脳 FP 細胞特異的表面抗原遺伝子として <i>Lrtm1</i> を同定した。そして抗 LRTM1 抗体を用いた細胞選別によってヒト多能性幹細胞由来ドパミン神経前駆細胞の割合を 80%以上に高めることに成功した。さらにこの LRTM1 陽性細胞をパーキンソン病モデルラットに移植し、ドパミン神経細胞の生着率が上昇すること、細胞増殖が抑えられること、運動機能が有意に改善することを明らかにした。</p> <p>以上の研究はドパミン神経前駆細胞を選別するための技術開発に貢献し、パーキンソン病に対する細胞移植治療の発展に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（佐俣 文平）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成28年12月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降